

Marcia Maria Strozolkouki

## MARCADORES DE DIAGNÓSTICO DA DOENÇA PERIODONTAL

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de ciência e saúde

Porto, 2016



Marcia Maria Strozolkouki

MARCADORES DE DIAGNÓSTICO DA DOENÇA PERIODONTAL

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de ciência e saúde

Porto, 2016

Marcia Maria Strozolkouki

## MARCADORES DE DIAGNÓSTICO DA DOENÇA PERIODONTAL

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências da saúde da Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária.

Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade de ciência e saúde  
Porto, 2016

## RESUMO

A periodontite é uma patologia inflamatória, causada pela interação entre o biofilme bacteriano e a resposta imune do hospedeiro e é caracterizada pela degradação de fibras colágenas do periodonto.

Os avanços científicos possibilitaram o desenvolvimento de novas técnicas que possibilitem o diagnóstico precoce da doença, ou seja, prevenir a perda de inserção e progressão da periodontite. O diagnóstico da doença periodontal baseia-se em parâmetros clínicos como profundidade de sondagem, perda de inserção, hemorragia a sondagem e exames radiográficos.

A análise dos biomarcadores presentes no fluido crevicular gengival (FCG) e saliva tem sido alvo de inúmeros artigos, uma vez que o fluido crevicular gengival (FCG) é composto de uma gama de biomarcadores celulares e moleculares.

O presente trabalho teve como objetivo fazer uma revisão narrativa da literatura publicada a cerca dos métodos utilizados para diagnóstico precoce e prognóstico dos processos patológicos que podem estar presentes no periodonto. Foi realizada uma pesquisa bibliográfica online entre Dezembro de 2015 e Maio de 2016, com o objetivo de fazer uma revisão bibliográfica acerca do tema. Não foi estabelecido restrição quanto a data de publicação.

Através da identificação da concentração de determinadas proteínas presentes no FCG é possível avaliar a atividade da doença periodontal e o prognóstico. Um importante número de marcadores como a elastase neutrofílica, prostaglandina E2, catepsinas, osteocalcina,  $\beta$ -glucuronidase, collagenase, fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase são citados (Genco *et al.*, 1992).

De acordo com a literatura publicada pode-se concluir que há alguns marcadores promissores para o diagnóstico precoce e prognóstico da doença periodontal, entretanto, não há ainda um marcador que possa identificar a futura perda de inserção ou a suscetibilidade à doença periodontal. São necessários estudos longitudinais para melhor entendimento do papel dos biomarcadores do FCG. Palavras chave: "*periodontal disease*"; "*Gingival Crevicular fluid*"; "*diagnosis*", "*biomarkers*".

## ABSTRACT

The periodontitis is an inflammatory pathology, caused by the interaction between biofilm and the host immune response, and is characterized by the degradation of collagen fibers of the periodontal.

The scientific advances permit the development of new techniques that allow the early diagnosis of the disease, that is, prevent the loss of insertion and advancement of periodontitis. The diagnosis of periodontal disease is based on clinical parameters such as probing depth, attachment loss, probing bleeding and radiographic examinations.

Thus, periodontal research for decades, focusing on the analysis of biomarkers present in the gingival crevicular fluid (GCF) and saliva. Gingival crevicular fluid (GCF) is composed of an array of cellular and molecular biomarkers

This study aimed to do a narrative literature review published about the methods for early diagnosis and prognosis of disease processes that may be present in the periodontium. An online bibliographic search was conducted between December 2015 and May 2016, aiming to make a literature review about the subject. A time limit was not established.

Through identifying the concentration of certain proteins present in the GCF it is possible to evaluate periodontal disease activity and prognosis of future disease. A large number of markers such as neutrophil elastase, prostaglandin E2, cathepsins, osteocalcin,  $\beta$ -glucuronidase, collagenase, alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase are cited Genco et al., (1992).

According to published literature it can be concluded that there are some promising markers for early opportune diagnosis and prognosis of periodontal disease, however, there is not still a marker that can identify future insertion loss and susceptibility to periodontal disease. Longitudinal studies are needed to better understand the role of FCG biomarkers.

*Key word: "periodontal disease"; "Gingival Crevicular fluid"; "diagnosis", "biomarkers".*

## DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho ao meu marido Peter, aos meus pais Maria José e Luiz  
e ao meu saudoso amigo e pai espiritual Padre Quinha, os quais em*

*todos os momentos me apoiaram e incentivaram.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por ter me conduzido e ter permitido a realização desse sonho.

Agradeço a Professora Cristina Lima por toda a ajuda e por ter aceitado ser minha orientadora.

Agradeço a todos que estiveram ao meu lado e de forma direta ou indireta sonharam junto comigo e me incentivaram nessa importante etapa da minha vida.

Agradeço ao meu marido Peter, meu companheiro de todas as horas, por todo o apoio, dedicação e amor nos momentos mais difíceis nessa jornada entre Porto-Amsterdam.

Agradeço aos meus pais Maria José e Luiz por todo apoio, incentivo e compreensão durante toda a minha caminhada e claro por sempre torcer por mim.

Agradeço aos meus queridos amigos Rosilene e Eduardo Borges que me apoiaram nos momentos difíceis e por todas as partilhas na nossa caminhada de fé.

Agradeço as minhas amigas queridas Daniela Mello, Daniele Carvalho, e a todos aos meus amigos pelo suporte, carinho e oração.

Agradeço aos novos amigos aqui de Porto, essa cidade maravilhosa, que me acolheram com tanto carinho.



## **ÍNDICE**

<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>II. DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>3</b>
<b>1. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>3</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Periodonto.....	4
2.2 Doença Periodontal .....	5
2.2.1 Patogénese da Doença Periodontal.....	7
2.3 Diagnóstico .....	11
2.4 Marcadores de Diagnóstico na Saliva.....	14
2.5 Marcadores de Diagnóstico no FCG.....	16
2.5.1 Método de Obtenção do FCG.....	16
2.5.2 Mediadores no FCG.....	19
2.5.2.1 Enzimas Derivadas do Hospedeiro.....	20
2.5.2.2 Mediadores Inflamatórios e Modificadores da Resposta do Hospedeiro.....	24
2.5.2.3 Produtos da Destruição Tecidular.....	25
2.5.3 Indicadores da Progressão da Doença.....	28
<b>3. DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>III. CONCLUSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>IV. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>36</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das doenças periodontais (Adaptado de Armitage, 1999) .....	7
Tabela 2 - Enzimas derivadas do hospeiro no FCG (Adaptada de Alrowis <i>et al.</i> , 2014)...	20
Tabela 3 - Mediadores inflamatório e modificadores da resposta do hospedeiro (Adaptada de Alrowis <i>et al.</i> , 2014) .....	24
Tabela 4 - Produtos de destruição tecidular - (Adaptada de Alrowis <i>et al.</i> , 2014) .....	26

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALP -	Fosfatase Alcalina
Anti-TAC-	Anticorpo para interleucina.
AST-	Aspartato amino transferase
AT -	Antripsina
BG-	$\beta$ - Glucoronidase
EIC -	Complexo Inibidor Proteínases
EIC-	Complexo inibidor da proteínase
FCG -	Fluido Crevicular Gengival
FSPI-	Fluido do sulco peri-implantar
GAG -	Glicosaminas Glicana
HA -	Ácido Hialurônico
HLA-DR-	Antígeno D do leucócito humano
ICTP-	Ligações cruzadas da piridinolina
IgG -	Imunoglobulina
IL -	Interleucina
IL-R-	Recetor da interleucina
LDH-	Lactato desidrogenase
Leu-	Leucócitos
LPS-	Lipopolissacarídeos
MCP-	Proteína quiotática monócito
MEC -	Matriz extracelular

MG -	Macroglobulina
MMP -	Metaloпротеínases
OC-	Osteocalcina
OPN-	Osteopontina
PA-	Ativador do plasminogênio
PAI-	Inibidor do ativador do plasminogênio
PGE-	Prostaglandinas
TIMP-	Inibidor tecidual da metaloproteinase
TNF-	Fator de necrose tumoral

## **I. INTRODUÇÃO**

A doença periodontal refere-se a patologias que afetam os tecidos de suporte dentário e pode-se classificar em gengivite ou periodontite.

A gengivite é uma condição inflamatória nos tecidos moles (gengiva) ao redor do dente como resposta direta à placa dentária acumulada no dente. A gengivite é modificada por diversos fatores como tabagismo, alguns medicamentos, e mudanças hormonais, como as ocorridas durante a gravidez. No entanto, na gengivite não há perda de inserção. A periodontite também é influenciada pela resposta imunológica e inflamatória individual. É iniciada pelo acúmulo de placa bacteriana, e na periodontite há destruição das estruturas de suporte do dente, incluindo o ligamento periodontal, osso e tecidos moles. A periodontite se não tratada poderá conduzir à perda do dente (Kinane, 2001).

Atualmente, o diagnóstico da doença periodontal é baseado em parâmetros clínicos como profundidade de sondagem, perda de inserção, hemorragia à sondagem e exames radiográficos. Contudo esses parâmetros clínicos não são suficientemente sensíveis e específicos para identificar a atividade da doença em locais individuais ou prever a futura destruição tecidular.

Há várias décadas que as pesquisas na área da Periodontologia se focam na análise da resposta inflamatória do hospedeiro por meio da saliva e do fluido crevicular gengival (FCG). O FCG é uma complexa mistura de substâncias derivadas do soro sanguíneo, leucócitos, células do periodonto e microrganismos orais. A composição do FCG parece ser uma ferramenta diagnóstica promissora e um meio para identificar o início da doença periodontal e o seu prognóstico. A identificação desses biomarcadores é importante para se ter acesso ao estado de atividade da doença periodontal e monitorização da resposta da terapia periodontal. Acredita-se que os componentes do FCG podem ajudar a elucidar os eventos iniciais da patogênese da doença periodontal, o que levaria a novos paradigmas no tratamento da doença periodontal, ou seja, permitiria identificar os indivíduos/ locais suscetíveis a doença periodontal e nesse caso um maior acompanhamento por parte do Médico Dentista.

Estudos sobre a análise do fluido crevicular gengival têm ganhado uma grande relevância nas últimas décadas com o objetivo de realizar um diagnóstico precoce, antes da destruição tecidual e prevenção da doença periodontal.

A coleta e análise do FCG provém de um acesso não invasivo, e pode ser intra ou extrassucular, a taxa de FCG coletado varia entre indivíduos saudáveis, portadores de gengivite ou entre diferentes estágios de periodontite. E então é feita uma análise bioquímica, a qual avalia o metabolismo celular local.

Através da identificação da concentração de determinadas proteínas presentes no FCG é possível avaliar a atividade da doença periodontal e o prognóstico da futura doença. Um importante número de marcadores como a elastase neutrofílica, prostaglandina E2,  $\beta$ -glucoronidase, collagenase, fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase são citados (Genco *et al.*, 1992).

O presente trabalho teve como objetivo fazer uma revisão narrativa da literatura publicada a cerca dos métodos utilizados para diagnóstico precoce e prognóstico dos processos patológicos que podem estar presentes no periodonto. Foi realizada uma pesquisa bibliográfica, sem restrição quanto à data de publicação, com o objetivo de fazer uma revisão bibliográfica acerca do tema.

Conclui-se que a avaliação dos fluidos orais é muito relevante e promissora para o diagnóstico precoce da doença periodontal e também para prever o tratamento periodontal, entretanto, não há ainda um marcador que possa identificar a futura perda de inserção ou a suscetibilidade a doença periodontal. São necessários estudos longitudinais para melhor entendimento do papel de biomarcadores do FCG.

## II. DESENVOLVIMENTO

### 1. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização do presente trabalho efectuou-se uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados PubMed, ScienceDirect e SciELO entre o mês de Dezembro de 2015 e o mês de Maio de 2016.

Foram usadas as seguintes palavras chave: "*periodontal disease*"; "*Gingival Crevicular fluid*"; "*diagnosis*", "*biomarkers*" separadas ou associadas, no sentido de estabelecer uma relação entre os termos pesquisados e obter resultados mais precisos.

Foram definidos os seguintes filtros de pesquisa: artigos analisados não apresentam restrição ao nível de data de publicação.; estudos realizados *in vivo*; em humanos; redigidos em língua inglesa e portuguesa com resumo disponível. A partir da leitura dos resumos foi possível iniciar a seleção dos artigos relevantes, para posterior obtenção dos artigos completos.

O interesse dos artigos encontrados foi avaliado inicialmente pelo título e, posteriormente, pelo resumo e texto completo.

De todos os artigos encontrados foram selecionados os considerados relevantes através dos seguintes critérios de inclusão:

- Artigos sobre biomarcadores e diagnóstico da doença periodontal.
- Artigos sobre patogénia da doença periodontal.
- Artigos de comparação dos marcadores biológicos em locais sãos e periodontais.
- Artigos de comparação dos marcadores biológicos em local com gengivite e locais com destruição tecidual.
- Artigos sobre os métodos de coleta do FCG.

Adicionalmente, foram utilizadas 2 obras literárias consideradas relevantes: Jan Lindhe, 2005 e Carranza Jr, 1996.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Periodonto**

“O Periodonto (perio = em torno de; donto = dente – conjunto de tecidos que circundam e sustentam o dente) é um complexo tecidular que forma uma unidade estrutural e funcional constituída pela gengiva, ligamento periodontal, cemento e osso alveolar” (Monteiro, 2010).

A principal função do periodonto é inserir o dente no tecido ósseo dos maxilares e manter a integridade da superfície da mucosa mastigatória da cavidade oral. A gengiva constitui o periodonto de proteção e, as demais estruturas, o periodonto de sustentação (Lindhe, 2005).

O cemento é considerado uma parte do ligamento pois junto com o osso, ele serve de suporte para as fibras do ligamento periodontal.

A gengiva é a parte da mucosa oral que recobre os processos alveolares dos maxilares e circunda os dentes, e anatomicamente esta dividida em três partes: marginal, aderida e áreas interdentárias (Carranza, 1996).

O epitélio gengival é definido em três áreas distintas do ponto de vista morfológico e funcional: o epitélio oral o epitélio sulcular e o epitélio juncional. O principal tipo celular do epitélio da gengiva, tal como em outros epitélios escamosos estratificados, é o queratinócito. No entanto, podem identificar-se outras células no epitélio: as células de Langerhans, as células de Merkel e os melanócitos.

A principal função do epitélio gengival é proteger as estruturas mais profundas ao mesmo tempo que permite uma troca seletiva com o ambiente oral.

O epitélio sulcular pode agir como uma membrana semipermeável através do qual produtos bacterianos difundem para o tecido gengival e, no sentido contrário, o fluido tecidular é exsudado para o sulco. Evidências histoquímicas da presença de polissacarídeos neutros na zona da aderência epitelial foram relatadas. Esses achados indicam que as células do epitélio juncional estão envolvidas na produção de laminina têm um papel fundamental no mecanismo de adesão.



Relativamente ao ligamento periodontal, podem-se identificar quatro tipos de células: células do tecido conjuntivo, restos epiteliais, células de defesa e células associadas com elementos neurovasculares. As células do tecido conjuntivo são os fibroblastos, os cementoblastos e osteoblastos; os fibroblastos parecem regular a renovação do colagénio. As células de defesa são os macrófagos, mastócitos e eosinófilos. O ligamento periodontal também contém em grande proporção substância fundamental preenchendo os espaços entre fibras e células. É composta por dois componentes importantes: glicosaminoglicanos, como ácido hialurônico; e proteoglicano e glicoproteínas, como a fibronectina e a laminina. Também apresenta alto conteúdo de água (70%). O ligamento periodontal também está em constante remodelação, acredita-se que o fluido crevicular gengival inicia a atividade dos anticorpos na defesa da gengiva (Carranza, 1996).

## **2.2 Doença Periodontal**

O termo amplo da doença periodontal inclui outras condições, como a gengivite, uma condição reversível que é diagnosticada pela presença e extensão da inflamação gengival, frequentemente avaliada pelo exame clínico da gengiva e hemorragia à sondagem. Estudos anteriores demonstraram que as duas doenças periodontais, gengivite e periodontite, foram combinadas e consideradas sendo contínuas.

Estudos epidemiológicos anteriores focaram na inflamação gengival, com o resultado dessas investigações houve um desenvolvimento de conceitos mais sofisticados e também, técnicas para avaliar a prevalência e a extensão da doença periodontal. Baseado nessas informações foram desenvolvidos: índice periodontal de Russell e o índice de doença periodontal. Ambos os índices eram baseados no conceito que a gengivite era um estágio inicial da periodontite, e que sem intervenção, iria progredir para periodontite (Page e Eke, 2007).

Em 1989 houve um Workshop mundial no qual os cientistas e Médicos Dentistas que atuam na periodontia concordaram sobre um sistema de classificação para doença periodontal. Essa classificação de 1989 não incluiu uma secção sobre a doença gengival. E isso foi corrigido pelo desenvolvimento de uma detalhada classificação de doenças gengivais e lesões que podem ou não ser induzidas por placa bacteriana. Uma

característica importante da secção sobre doenças gengivais é a confirmação que a expressão clínica da gengivite pode ser modificada por fatores como: fatores sistêmicos, como desordens no sistema endócrino, medicação e deficiência nutricional (Armitage, 1999).

Champagne (2003) afirmou que a gengivite ocorre naturalmente na maioria das pessoas, apesar de diferentes graus de severidade. É caracterizada por uma mudança na composição da placa microbiana, pois há um aumento de microorganismos gram-negativos, os quais, induzem uma resposta local do hospedeiro, que produz eritema gengival, edema e hemorragia à sondagem.

A periodontite é caracterizada por intenso infiltrado inflamatório causando perda progressiva da inserção conjuntiva e podendo ocorrer em indivíduos saudáveis de qualquer idade.

Page e Eke (2007) definiram a periodontite como uma doença inflamatória crônica causada pela infecção dos tecidos de suporte dos dentes. Essa infecção começa com a colonização e o crescimento de bactérias predominantemente anaeróbias gram-negativas e espiroquetas, como por exemplo a *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*. Estas bactérias, incorporados com outras espécies no biofilme, estendem-se apicalmente junto da superfície da raiz do dente causando a formação de bolsas periodontais e a destruição do osso alveolar e da inserção de fibras colágenas do ligamento periodontal. Geralmente o diagnóstico clínico da periodontite é baseado na medição da profundidade de sondagem, perda de inserção, no padrão e extensão da perda do osso alveolar.

AlMoharib *et al.* (2014) refere que a periodontite inicia e progride através de uma complexa interação entre os patógenos e o sistema de defesa do hospedeiro.

Em indivíduos sujeitos a distúrbios hormonais, como as crianças durante a puberdade e mulheres grávidas, há uma exacerbação dos sinais clínicos da gengivite. Alguns medicamentos como a Nifedipina, anti-hipertensivo bloqueador do canal de cálcio, Fentoína (anti-epilético) e Ciclosporina (imunossupressor) podem induzir uma hiperplasia gengival em aproximadamente 30% das pessoas que utilizam esses medicamentos. Essa hiperplasia gengival é uma resposta exagerada à placa bacteriana, que é necessária para a gengivite e, conseqüentemente, os efeitos dos medicamentos sobre

a gengiva (Kinane *et al.*, 2001).

Muitos esquemas de classificações para a doença periodontal foram propostos ao longo do século passado. Em 1999, no Workshop Internacional propôs-se uma alteração na classificação da doença e condições periodontais. Sucintamente, a classificação consiste nas condições de doença listada na tabela 1.

Doenças gengivais: Gengivite
Periodontite crónica
Periodontite agressiva
Periodontite como manifestação de doença sistémica
Doenças periodontais necrosantes
Abscesso do periodonto
Periodontite associada com lesões endodônticas
Deformidades e as condições de desenvolvimento adquiridas

Tabela 1 - Classificação das doenças periodontais (Adaptado de Armitage, 1999)

### 2.2.1 Patogénese da doença periodontal

Kinane *et al.* (2001) estudaram a patogenia da doença periodontal, e afirmaram que a gengiva normal e saudável é caracterizada por uma cor rosa, consistência firme e aspeto picotado. Os tecidos gengivais interdentais são firmes, não sangram com a sondagem e preenchem os espaços interdentários. Na teoria, a gengiva normal não possui evidências histológicas de inflamação, mas essa condição ideal é raramente vista em secções microscópicas de tecidos. Isso acontece porque a maioria dos tecidos gengivais, mesmo que clinicamente são, apresentam uma leve inflamação devido a constante presença de placa microbiana. Mesmo num estado muito saudável, a gengiva possui um infiltrado de leucócitos que é predominantemente composto por neutrófilos ou leucócitos polimorfonucleares. Esses leucócitos são fagócitos e a principal função é matar bactérias depois da migração na área crevicular gengival ou na bolsa gengival.

De acordo com Lindhe *et al.* (2005) a formação do biofilme na superfície dos dentes adjacentes aos tecidos gengivais promove o contato das células do epitélio do sulco e do epitélio juncional com os produtos residuais, enzimas e componentes da superfície das bactérias em colonização.

Kinane *et al.* (2001) descrevem que os neutrófilos são recrutados para a bolsa periodontal ou sulco gengival por causa da atração de moléculas, libertadas pelas bactérias, chamadas peptídeos quimiotáticos. As células epiteliais, ativadas pelas substâncias microbianas, produzem citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores químicos da inflamação. Esses mediadores induzem uma resposta inflamatória no interior dos tecidos gengivais, que acompanha a via clássica da inflamação (Lindhe *et al.*, 2005). As citocinas promovem ainda a quimiotaxia de leucócitos, predominantemente neutrófilos. Os neutrófilos no interior do sulco gengival podem fagocitar e digerir as bactérias. Os neutrófilos podem ainda libertar grânulos, cujo conteúdo causa dano nos tecidos pela toxicidade das enzimas que são liberadas. O mecanismo de atuação dos neutrófilos pode, em algumas situações, ajudar e reduzir a carga bacteriana e ser considerada importante na prevenção da gengivite. Se, contudo, existe uma sobrecarga de placa bacteriana, os neutrófilos e a barreira de células epiteliais não serão suficientes para o controle da infecção (Kinane *et al.*, 2001). Nessas circunstâncias, o tecido gengival ficaria inflamado e os sinais clínicos de gengivite desenvolvem-se (Lindhe *et al.*, 2005).

Muitos indivíduos desenvolvem sinais clínicos de gengivite após 10-20 dias de acúmulo de placa bacteriana. A gengiva fica avermelhada, edemaciada e aumenta a tendência de hemorragia gengival à sondagem. Nesse momento a inflamação gengival é reversível se a placa for removida e houver um controle efetivo de placa. Contudo, microscopicamente os tecidos mostram mudanças histopatológicas. Essas mudanças incluem a vasodilatação. Exsudado e proteínas do sangue causam o edema e há um influxo de células inflamatórias ou leucócitos nos tecidos. As células inflamatórias incluem linfócitos, macrófagos e neutrófilos. Macrófagos e neutrófilos são células fagocitárias, as quais englobam e digerem as bactérias. Enquanto que os linfócitos trabalham na resposta imune contra as bactérias. Os neutrófilos possuem um mecanismo anti-microbiano altamente especializado, e formam a primeira linha de defesa contra o biofilme bacteriano (Champagne *et al.*, 2003).

Kinane *et al.* (2001) citam que é muito raro uma gengiva clinicamente saudável e sem nenhum sinal histopatológico de inflamação. A histopatologia da lesão precoce de gengivite aparenta ter um significativo infiltrado de células inflamatórias, mas também células do plasma em pequena quantidade. Clinicamente, com a estabilização da gengivite não há perda óssea ou migração epitelial apical.

Lindhe *et al.* (2005) afirmam que estágios iniciais, predominam os PMNs devido a mobilidade e à flexibilidade destas células e aos efeitos das moléculas de adesão sobre os vasos sanguíneos que aderem preferencialmente aos PMNs. Além disso, é estabelecido um gradiente quimiotático dos produtos bacterianos, PMNs são atraídos na direção do sulco gengival. Assim, a gengiva torna-se edemaciada conforme o líquido se acumula e começa a infiltração celular.

Champagne *et al.* (2003) afirmam que na gengivite, a maioria de mediadores identificados no FCG são neutrófilos, incluindo os leucotrienos B4, elastase e colagenase (MMP's). Lindhe *et al.* (2005), demonstram que os fatores quimiotáticos incluem proteínas e peptídeos microbianos, assim como fatores do hospedeiro, como as quimiocinas (principalmente IL-8), moléculas produzidas por neutrófilos, como o leucotrieno B4 e moléculas derivadas do sistema complemento. O aumento do nível de interleucina-8 no FCG é um dos primeiros sinais associados com a transição de uma gengiva saudável para gengivite (Tonetti *cit in* Champagne, 2003).

A gengivite é um quadro reversível, no entanto na periodontite é considerada uma patologia irreversível. A periodontite é caracterizada clinicamente pela migração epitelial ao longo da raiz, aumentando a profundidade de sondagem e perda da crista óssea (Kinane *et al.*, 2001).

Na periodontite, a placa microbiana gram-negativa evolui e se coloniza profundamente no sulco gengival e propaga uma resposta inflamatória crônica (Champagne *et al.*, 2003). O processo patogénico da doença periodontal é em grande parte o resultado da resposta do hospedeiro à destruição tecidual induzida pelos microorganismos. Esse processo de destruição é iniciado pelas bactérias, mas é perpetuado pelas células do hospedeiro, sendo que a própria resposta do hospedeiro à presença das bactérias resulta na destruição tecidual. O hospedeiro produz enzimas que destroem os tecidos. Os patógenos periodontais e outros anaeróbios produzem uma variedade de enzimas e toxinas que podem danificar os tecidos e iniciar a inflamação. Eles também produzem produtos residuais nocivos que provocam irritação nos tecidos. Essas enzimas degradam as substâncias extracelulares, como o colagénio e até células das membranas do hospedeiro que produzem nutrientes para o crescimento. Muitas proteínas da superfície microbiana são capazes de iniciar a resposta imune do hospedeiro e também capazes de induzir a inflamação local no tecido. Desta forma os

microorganismos podem causar danos nos tecidos do hospedeiro e instigar a resposta inflamatória e imune. Uma vez que o processo imunológico e inflamatório é iniciado, muitas moléculas inflamatórias como as proteases, citocinas, prostaglandinas e enzimas do hospedeiro são libertadas dos leucócitos e fibroblastos ou células estruturais dos tecidos (Kinane *et al.*, 2001). Forma-se na gengiva um infiltrado de células inflamatórias que precisam de espaço no periodonto para iniciar sua função, e com isso há perda dos componentes estruturais (fibroblastos, colagénio, matriz), criando espaço para os leucócitos infiltrantes. Muitas células do infiltrado inflamatório produzem citocinas e enzimas que degradam a matriz e também causam a destruição direta e indireta do tecido conjuntivo e do osso (Lindhe *et al.*, 2005)

O tecido periodontal perde aderência ao dente e os tecidos aumentam o volume e ficam inflamados, e com isso as células epiteliais proliferam apicalmente ao longo da superfície da raiz do dente e a bolsa torna-se profunda. Simultaneamente ocorre a extensão do infiltrado de tecido inflamatório. Nesta fase os osteócitos começam a destruição do osso (Kinane *et al.*, 2001). A reabsorção óssea ocorre a fim de promover mais espaço para as células de defesa (Lindhe *et al.*, 2005). O acúmulo de placa subgengival aumenta e, portanto, há um aumento da densidade microbiana que promove a propagação dessa lesão periodontal destrutiva. Como o aprofundamento da bolsa a flora torna-se mais anaeróbica e a resposta do hospedeiro torna-se mais destrutiva e crónica (Kinane *et al.*, 2001). Lipopolissacarídeos penetram nos tecidos, estimulando monócitos, os quais secretam mediadores inflamatórios, incluindo prostaglandina E2, tromboxano B2, interleucinas (1,6 e 8), fator de necrose tumoral e collagenase (Champagne *et al.*, 2003).

Os PMNs são atraídos para a área juntamente com os outros leucócitos, como os monócitos, macrófagos e linfócitos. Os macrófagos provavelmente são as únicas células, além dos PMNs, que desempenham uma função útil no sulco gengival; eles podem fagocitar os PMNs mortos ou que estão morrendo no sulco gengival. Isto é de grande importância para o hospedeiro, uma vez que os PMNs que estão morrendo sofrerão desgranulação e liberação de suas enzimas de maneira descontrolada, o que pode causar maior danos aos tecidos do hospedeiro e aumentar a inflamação. A outra função importante do macrófago é a apresentação de antígeno que ocorre dentro do tecido conjuntivo da gengiva juntamente com as funções imunes das células B e T. Esta apresentação de antígeno provoca o retorno dos linfócitos envolvidos para a área de exposição microbiana, onde as células B são

transformadas em plasmócitos, produzindo anticorpos, ou as células T começam a auxiliar esta resposta humoral e a desenvolver respostas imunes mediadas pela célula contra esses microrganismos. A produção de anticorpos pode ser local ou sistémicas e estes agem agregando ou formando grupo de microrganismos, evitando aderência desses últimos ao epitélio, atuando junto com o complemento para destruí-los e em associação com os PMNs, permitindo a eficácia da fagocitose (Lindhe *et al.*, 2005). Eventualmente, o progresso da lesão periodontal estende-se até à perda do dente (Kinane *et al.*, 2001).

### 2.3 Diagnóstico

Geralmente o diagnóstico da doença periodontal é baseado em parâmetros clínicos como profundidade de sondagem, perda de inserção, hemorragia à sondagem e exames radiográficos (Page e Eke, 2007). Contudo, estes parâmetros clínicos não são suficientemente sensíveis e específicos para identificar a atividade da doença em locais individuais ou prever a perda de inserção. Os fluidos orais reflectem a saúde periodontal e é um meio de informação clinicamente relevante, uma vez que contém marcadores específicos da doença periodontal (Cafiero e Mataraso, 2013). O FCG tem tido muita importância em relação ao possível diagnóstico da doença periodontal (AlRowis *et al.*, 2014). A saliva é utilizada também como um meio de diagnóstico, pois possui muitos biomarcadores que são efetivos no diagnóstico da doença local e sistémica ou na monitorização do efeito do tratamento (AlMoharib *et al.*, 2014).

Um marcador biológico é uma substância que é objectivamente medida e avaliada como um indicador dos processos biológicos normais, processos patogénicos, ou respostas farmacológicas a intervenção terapêutica. A saliva e FCG são facilmente coletadas e contém biomarcadores da doença periodontal, eles podem oferecer a base para uma avaliação de um biomarcador específico do paciente para a periodontite e outras doenças sistémicas, recentemente o fluido gengival tem sido usado no diagnóstico do HIV (Taba *et al.*, 2005).

Devido à natureza não invasiva e simples da sua coleta, a análise da saliva e FCG pode ser especialmente benéfica para a determinação da condição periodontal actual e um meio de controlo da resposta ao tratamento. Muitos estudos têm demonstrado que a determinação dos níveis de mediadores inflamatórios em fluidos

biológicos é um bom indicador da actividade inflamatória. Por tanto, os estudos relacionados à patogénese da doença periodontal examinam se marcadores bioquímicos e imunológicos na saliva ou FCG pode refletir a extensão da destruição periodontal e possivelmente prever a progressão da doença futura. (Ozmeric *et al.*, 2004; Champagne *et al.*, 2003; Armitage, 2004; AlMoharib *et al.*, 2014).

Contudo, o objetivo desse trabalho é focar na avaliação dos marcadores encontrados no FCG.

O estudo FCG tem sido de grande interesse devido a sua composição, a qual inclui uma mistura de moléculas do sangue, tecidos do hospedeiro, biofilme, proteínas, citocinas, anticorpos, antígenos bacterianos, enzimas. Esses biomarcadores têm sido avaliados como potentes ferramentas na diferenciação da periodontite e gengivite e locais são e também para a monitorização do tratamento da doença periodontal (Taba *et al.*, 2005).

No campo do diagnóstico da doença oral, há uma forte tendência, durante as últimas 2 décadas, a desenvolver ferramentas para monitorização da periodontite. A partir de medições físicas, tais como sondagem periodontal para analisar a suscetibilidade genética e os ensaios moleculares para a detecção de biomarcadores sobre as diferentes fases da doença, melhoras substanciais foram feitas na compreensão dos mediadores envolvidos na iniciação e progressão da periodontite. Ao mesmo tempo, este processo evolutivo promoveu a descoberta de novos biomarcadores e o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que utilizam principalmente modulação hospedeiro. Além disso, as novas tecnologias de diagnóstico, estão em desenvolvimento para a avaliação e rastreio de biomarcadores. Estes avanços recentes estão levando ao desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico mais potentes para os profissionais otimizarem sua previsibilidade do tratamento.

Várias moléculas bioquímicas estão envolvidas nas três fases da doença periodontal: inflamação, degradação do tecido conjuntivo e remodelação óssea alveolar (Gemmell *et al.*, 1997)

As citocinas e quimiocinas, identificadas na imunopatogénese da periodontite, conduzem à migração e à manutenção de vários tipos celulares como os leucócitos polimorfonucleares, células Natural-Killer, macrófagos, e linfócitos nos tecidos



gingivais. Desta forma, estas células agem na resposta imune e inflamatória com o objetivo de eliminar o patógeno e na produção de citocinas. Este mecanismo de auto-regulação da resposta e recrutamento seletivo dos tipos celulares leva à produção de diferentes citocinas no local da resposta, podendo determinar a progressão ou não doença. Portanto, a expressão de diferentes citocinas pode representar fenótipos e estágios de desenvolvimento da doença ou transição de fases das doenças periodontais (Gemmell *cit. in* Costa, 2012).

Vários estudos têm relatado a presença de citocinas na doença periodontal. Pilon *cit. in*. Gemmell *et al.* (1997) demonstraram níveis mais baixos de IL-2 no FCG de local com periodontite em comparação com os locais saudáveis.

Uma das citocinas envolvidas na patogénese da doença periodontal é um factor de necrose tumoral ( $\alpha$ -TNF), que está presente em níveis elevados no fluido crevicular gengival de locais doentes. Estudos em ratos e primatas demonstram claramente que o ( $\alpha$ -TNF), desempenha um papel central no processo inflamatório, na reabsorção do osso alveolar e na perda de inserção de tecido conjuntivo em doenças periodontais experimentais. Várias outras citocinas também parecem estar envolvidas na imunopatogénese das doenças periodontais. Enquanto citocinas inflamatória (interleucina-1 e -6) e T auxiliar tipo 1 têm sido associados com maior gravidade da doença periodontal (Garlet *et al.*, 2006).

A citocina inflamatória IL-1 é um mediador principal de respostas inflamatórias que actuam sobre muitos tipos de células e é produzido por muitas células diferentes, incluindo macrófagos, células endoteliais, células B, fibroblastos, células epiteliais, astrócitos e osteoblastos em resposta a microorganismos, toxinas bacterianas. Uma das ações mais importantes da IL-1 é a indução de outras citocinas. Assim como a IL -1 parece ter um papel importante na mediação das respostas inflamatórias e imunes iniciadas por infecção. A IL-1 têm sido mostrados para agir sobre as células endoteliais para aumentar a ligação de neutrófilos polimorfonucleares e monócitos e, assim, ajudar a recrutar estas células em locais de inflamação.

A IL-1 e TNF- $\alpha$  são mediadores chave de doenças inflamatórias crónicas e têm o potencial para iniciar a destruição dos tecidos e perda óssea na doença periodontal. IL-1 é conhecida como um indutor mais potente de desmineralização óssea e sinergiza com

um factor de necrose tumoral em estimular a reabsorção do osso, bem como grandes mudanças na matriz do tecido conjuntivo (Gemmell *et al.*, 1997).

As citocinas são reguladoras celulares e produzidas principalmente por linfócitos T e macrófagos e estão envolvidas no processo inflamatório. Elas possuem diversas funções na resposta imuno-inflamatória, na regulação do crescimento e diferenciação das células e são consideradas reguladoras do processo imuno-inflamatório na periodontite. As quimiocinas por sua vez, são moléculas relacionadas a migração e ativação de leucócitos, tráfico de linfóides e desenvolvimento de células T (Gemmell *cit. in* Paganini 2012).

## 2.4 Marcadores de Diagnóstico na Saliva

AlMoharib *et al.* (2014) realizam uma pesquisa com o foco na avaliação dos marcadores bioquímicos na saliva que aparentam ser promissores no diagnóstico da futura doença periodontal, bem como alguns testes que estão disponíveis. Medidas clínicas tradicionais, como a profundidade de bolsa, hemorragia a sondagem, perda de ligamento, índice de placa e radiografias utilizadas para o diagnóstico periodontal são muitas vezes de utilidade limitada pois são indicadores da doença prévia e não indicadores da atividade da doença. Foi analisada informação sobre artigos publicados entre 1999 e 2014. Foram discutidos separadamente cada marcador com base nas evidências disponíveis.

- Lactate desidrogenase (LDH)- Nagler *et al.* (2001) mostraram um aumento na atividade LDH num local com aumento da profundidade de bolsa em comparação com um local saudável, sugerindo que clinicamente é um importante marcador
- Matriz metaloproteinase (MMP) – são as proteinases mais importantes para iniciar a destruição do colagénio tipo I e III. Miller *cit. in* Almoharib *et al.* (2014) demonstraram que as MMPs foram encontradas em concentrações quatro vezes maiores em pacientes com periodontite em comparação com pacientes saudáveis. Foi sugerido que o elevado nível de MMP-8 é correspondente a fase de degradação de colagénio da doença periodontal e deve ser utilizado como monitorização da atividade da doença.

- Lisozima - De acordo com Surna *et al.* (2009) após o controle de placa, a redução no nível dessa enzima deve ser sugestiva de uma futura doença periodontal
- Chitinase - Van Steijn *et al.* (2002) mostraram que essa enzima apresentou um aumento na saliva de pacientes com periodontite e diminuiu após o tratamento
- Aspartate aminotransferase (ALT) - Nomura *et al.* (2012) detectaram que o nível desse marcador tende a ser maior em pacientes que desenvolvem a periodontite, e concluíram que ALT em combinação *P.Gingivalis* é a ferramenta mais promissora para prever o diagnóstico da progressão da doença periodontal.
- Fosfatase alcalina – É um possível indicador da inflamação gengival e de reabsorção óssea. (Dabra *cit.in* Almoharib *et al.*, 2014)
- Lactoferrina- Groenink *et al.* (1999) identificaram uma alta quantidade de lactoferrina no FCG durante a inflamação gengival e também uma alta concentração na saliva de pacientes com periodontite em comparação com pacientes saudáveis.
- Proteína C-reativa - Christodoulides *et al.* (2005) relatam altos níveis de PCR em associação com doença periodontal crônica e agressiva.
- Queratina epitelial - MC Laughlin *et al.* (1996) estudaram o nível de queratina no FCG e demonstraram que a sua concentração era significativamente maior nos locais com sinais de periodontite em comparação com locais saudáveis.
- Imunoglobulina (IgG) – Hägewald *et al.* (2002) realizaram um estudo que mostrou que as IgGs têm influência na microbiota oral, pois elas interferem na aderência e no metabolismo bacteriano, um aumento de na concentração de Ig A, Ig G e Ig M foi encontrado em pacientes com doença periodontal.

A saliva, uma secreção exócrina das glândulas salivares, consiste em água, eletrólitos, enzimas, IgG, glicoproteínas e numerosas proteínas antimicrobianas, fatores de crescimento e peptídeos reguladores (Sexton, 2001). De acordo com a revisão verificou-se que vários indicadores salivares estão disponíveis para detectar a presença e severidade da doença periodontal e a resposta ao tratamento. Com o advento de técnicas altamente sensíveis, vestígios de marcadores podem ser estabelecidos com precisão na saliva. A saliva contém mediadores derivados da doença periodontal, incluindo patógenos e marcadores. A maioria dos biomarcadores no FCG e saliva são indicadores de eventos inflamatórios que precedem a destruição do osso alveolar. Os autores que

relataram que a saliva apresenta um elevado potencial para a monitorização da doença periodontal e concluíram que mais estudos são necessários para avaliar a sensibilidade e a confiabilidade desses indicadores que podem ajudar no desenvolvimento de testes não invasivos que auxiliem no diagnóstico e prognóstico da doença periodontal (AlMoharib *et al.*, 2014).

## **2.5 Marcadores de Diagnóstico no Fluido Crevicular Gengival**

Desde 1960, quando foi sugerido pela primeira vez, que a análise do FCG poderia ser um caminho para avaliar o estado inflamatório da gengivite e periodontite, desde então, há um interesse intenso no potencial do FCG como meio de diagnóstico. O FCG é um exsudato inflamatório que infiltra no sulco gengival ou na bolsa periodontal envolta do dente que possui inflamação na gengiva. É composto por soro e matérias geradas localmente, como os produtos de degradação tecidual, mediadores inflamatórios anticorpos que agem diretamente contra a placa bacteriana. A quantidade de FCG produzida é diretamente relacionada como o aumento da permeabilidade vascular e a ulceração do epitélio da bolsa nos locais inflamados (Armitage, 2004).

### **2.5.1 Métodos de obtenção do FCG**

Barros *et al.* (2016) realizaram um estudo sobre a coleta do fluido crevicular gengival e constataram, portanto, que esta abordagem tem sido muito explorada no intuito de identificar biomarcadores potenciais da doença periodontal por ser um método simples, não invasivo. O fluido crevicular gengival resulta da interação entre o biofilme bacteriano e as células dos tecidos periodontais, sendo um fluido oral que poderá ser utilizado como meio diagnóstico adicional devido à facilidade da coleta e por permitir amostras de vários locais simultaneamente na cavidade oral. O fluxo de FCG move-se dentro e fora da bolsa periodontal ou sulco gengival. É uma pequena corrente, geralmente apenas alguns microlitros por hora (Goodson, 2003).

Há varios métodos de coleta do fluido crevicular gengival. A maioria dos estudos coletam o fluido gengival com a tira de papel (Periopaper®). Alguns estudos coletam FCG por um período determinado de tempo, geralmente 30 segundos, e avaliam a quantidade total do mediador coletado na tira de papel por eluição, ou seja, separação das substâncias absorvidas, seguida por um exame específico e com isso, é possível

realizar um estudo da composição do FCG. Estas investigações expressam o nível, com massa total, do biomarcador presente (Barros *et al.*, 2016).

De acordo com Chibebe *et al.* (2008) vários métodos foram desenvolvidos para coletar o fluido gengival crevicular. Entre eles, podem-se destacar:

- *Método de lavagem gengival*: o sulco gengival é irrigado com uma solução isotônica (solução de Hank's) e o fluido coletado representa uma diluição do fluido sulcular contendo células e constituintes solúveis;
- *Por meio de túbulos microcapilares ou micropipetas*: após o isolamento e secagem do local selecionado, túbulos capilares de diâmetros conhecidos são inseridos na entrada do sulco gengival; com este método é possível calcular o volume coletado;

Antes da coleção do FCG, a área ao redor do dente é isolada com rolos de algodão, secados com um curto jato de ar e placa supragengival deve ser removida com uma cureta estéril. Amostras de FCG devem ser coletadas nos locais utilizando uma ponta longa micropipeta. Amostras FCG resultantes foram colocadas em tubos de Eppendorf pequeno (tubo de microcentrifuga), centrifugada a 1000 g por 5 minutos e armazenados a -80° C até a análise. No descongelamento, amostras FCG devem ser pesadas para determinar o volume de FCG coletado, então diluído em tampão fosfato salino (PBS) para um volume final e submetido a convencionais colorimétricas ou ensaio fluorimétrica usando substratos específicos para cada uma das enzimas (Gul *et al.*, 2016).

- *Utilização de tiras de papel filtro*: técnica rápida, fácil de usar, atraumática e que pode ser aplicada em locais individualizados. As tiras podem ser inseridas no sulco gengival ou bolsa periodontal. A coleta das amostras pode ser por um período de tempo específico ou indeterminado. Utiliza-se normalmente a tira de papel (*Periopaper®*).

O local de coleta da amostra é isolado com rolos de algodão e gentilmente seco com jato de ar, e uma tira de papel *Periopaper®* é colocada no sulco gengival por 30 segundos. Após remover do sulco, a *Periopaper®* e pode ser inserida no dispositivo *Periotron 8000®*, o instrumento é previamente calibrado, para medir o volume de fluido

coletado. Então, a tira de papel é envolta em papel alumínio, transferida para o líquido de hidrogênio e armazenada no líquido de nitrogênio até for requerida pelo ensaio. O armazenamento do fluido crevicular gengival em azoto líquido tem várias vantagens em relação a armazenagem a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O nitrogênio líquido é mais frio ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) mas, mais importante, ele desloca oxigênio dissolvido na fase fluida. Isto evita a oxidação das amostras biológicas e a reação com  $\text{H}_2\text{O}$  molecular. Como consequência, as amostras podem ser armazenadas por décadas em azoto líquido e manter-se estável, não degradada, não oxidada, não modificada por enzimas e assim permanece disponível para análise molecular.

A sequência da coleta do fluido crevicular gengival, e o uso do instrumento Periotron®, que é um instrumento de mensuração eletrônica, ligado ao um programa de computador, o qual quantifica o volume do FCG e permite uma avaliação da amostra coletada. Uma leitura de 0 - 20 no medidor Periotron® indica que o tecido é saudável e mostra pouca ou nenhuma inflamação. Leituras aumentam de acordo com o aumento da gravidade da inflamação. Uma leitura entre 20 e 60 indica inflamação leve, mas não periodontite; 60-150 indica a condição moderadamente grave e  $> 150$  indica uma inflamação mais grave. Acima de uma leitura de cerca de 60, pode-se esperar que a atividade bacteriana a ser um fator de risco bastante grave para periodontite para prosseguir. Em outras palavras, pode-se esperar a esses níveis, com tempo para ver evidência clínica de perda de inserção epitelial e desenvolvimento bolsa periodontal que, no devido tempo, pode ser mensurável sobre a sondagem periodontal. Quanto mais tempo que o FCG está acima deste nível, maior a chance de que o método relativamente insensível de sondagem periodontal irá indicar danos periodontais.

Gustafsson *et al.* (1996) avaliaram a recuperação de certas proteínas com diferentes pesos moleculares e avaliou o uso de tiras de papel comparados com outros métodos de obtenção disponíveis: tubos capilares, bomba intracrevicular e tiras de papel. Os tubos capilares podem ser usados para medir volume do fluido, mas o colhimento prolongado (mais que quinze minutos) resulta num trauma considerável nos vasos sanguíneos gengivais, mudando a densidade do FCG e a concentração de vários componentes. A bomba intracrevicular não causa trauma significativo nos vasos sanguíneos mas não permite mensuração do volume, o qual é necessário para ressaltar a influência do volume no fundo de bolsas periodontais. A utilização de tiras de papel é a técnica mais comum. Os autores

relatam que se o requisito para o estudo for a avaliação do volume de várias proteínas no FCG, as tiras de papel serão o melhor método. Este método demonstrou um satisfatório meio de obtenção de muitas proteínas se a purificação é feita num meio tampão isotônico, num pH neutro e sem detergentes pra minimizar a adição de proteínas da lise de neutrófilo. Contudo, a obtenção de complexo de elastase é fraca.

Guentsch *et al.* (2011) realizaram um trabalho com o objetivo de comparar os métodos de coleta de FCG em pacientes com periodontite crônica. Os pacientes foram distribuídos aleatoriamente por lote em um dos três grupos. Grupo 1 utilizou tira de papel em comparação com pontas de papel, o grupo 2 tiras de papel em comparação com técnica de lavagem, e grupo 3 pontas de papel em comparação com a técnica de lavagem. FCG foi coletado em cada paciente com duas técnicas de amostragem, apenas nos molares com uma profundidade de sondagem de pelo menos 5 mm e inferior ou igual a 7 mm. Um método foi realizado num molar superior e inferior do lado direito e a outro método em molares do lado esquerdo da cavidade oral correspondente. Depois de uma semana, repetiu-se a recolha das amostras utilizando os locais opostos. Os locais a serem amostrados foram isolados com rolos de algodão e gentilmente secas ao ar, tiras de papel e pontas de papel foram cuidadosamente colocadas durante 30 segundos na bolsa até que houvesse uma resistência mínima. As amostras foram eluídas a 4 ° C durante a noite em 500 ul de solução salina tamponada de fosfato (PBS). Depois de ter sido centrifugado a 400 g durante 4 min, as tiras e as pontas de papel foram removidos; ambos foram mantidos congelados a -20 ° C até serem ensaiadas. Lavagens crevicular foram realizadas, um ponta capilar de carga de gel foi cuidadosamente inserida na fenda a um nível de aproximadamente 1 mm abaixo da margem gengival. Em cada caso, 5 lavagens sequenciais com 10 ul de cloreto de sódio a 0,9% foram realizadas utilizando uma micropipeta. As lavagens foram transferidos para um tubo de microcentrífuga, centrifugado a 400 g durante 4 min; A seguir, a amostra flutuante foi imediatamente congelada e mantidos a -20 ° C até serem analisadas. Todas as amostras contendo sangue foram descartados e a amostragem foi repetida após dois dias. Foi concluído que a técnica de lavagem é um método alternativo de coleta de FCG, para fins especiais, quando a coleta por métodos em tiras papel falhar. Pontas de papel são adequados para determinação da microflora e pode ser recomendada para a análise microbiológica diária na prática odontológica. As tiras de papel são o método de escolha para a maioria dos biomarcadores em estudos imunológicos.

### 2.5.2 Mediadores no FCG

Alrowis *et al.* (2014) realizaram um estudo entre os principais artigos entre 1999 e 2014 sobre os marcadores da doença periodontal no FCG, e escreveram que o diagnóstico periodontal é baseado na medição da profundidade de bolsa, nível gengival, índice de placa, índice gengival, hemorragia ou supuração a sondagem, envolvimento de furca, mobilidade e achados radiográficos; contudo esses parâmetros clínicos não são suficientemente sensíveis específicos para identificar a atividade da doença em locais individuais ou prever a perda de inserção. Nesse estudo foi discutido sobre o FCG, o qual pode estar presente em quantidades pequenas em locais sãos, porém a monitorização da presença dos componentes do FCG pode ser de grande valor na avaliação do estado da doença periodontal ou na futura terapia periodontal. O acúmulo de FCG na margem gengival contém potentes marcadores derivados não somente dos tecidos do hospedeiro, mas também da placa subgengival. Os autores dividiram os marcadores em três categorias: indicadores da doença periodontal, preditores da progressão da doença e os preditores da iniciação da doença num local atualmente saudável. Nesse estudo os potentes marcadores do FCG foram divididos em três grupos: enzimas derivados do hospedeiros, mediadores inflamatórios e produtos da degradação de tecidos. O presente estudo teve como objetivo descrever os mediadores encontrados no FCG. O resultado da revisão aponta o FCG como um meio promissor para detectar a atividade da doença periodontal.

#### 2.5.2.1 Enzimas derivadas do hospedeiro

MMP-1
MMP-2
MMP-3
MMP-8
MMP-9
MMP-13
TIMP-1
Elastase
Catepsina G, D, B
Beta-N-acetil-hexosaminidase
$\alpha$ 1-proteinase inibidor
$\alpha$ 2-macroglobulina
AST



Gingipain
Plasminogen
Glicosidases
Mieloperoxidase
Creatinina quinase
Protease neutra
Peptidases Dipeptidil, ALP, BG, estromelinas, lactato desidrogenase arilsulfatase, lisozima, dipeptidil peptidase, creatina quinase enzimas de degradação da imunoglobulina BG, enzimas tripsina

Tabela 2-Enzimas derivadas do hospeiro no FCG (adaptada de Alrowis *et al.*, 2014)

- Aspartato aminotransferase (AST) – (Chambers *cit. in* Almoharib *et al.*, 2014) constataram que essa enzima é liberada para o meio extracelular quando há morte celular. O nível dessa enzima é elevado nos locais com periodontite ativa. No FCG, em locais com perda de ligamento e inflamação, foi identificada um elevado nível de AST.
- Fosfatase alcalina- (Daltaban *cit. in* Almoharib *et al.*, 2014) sugeriram a fosfatase alcalina como um marcador de diagnóstico potencial para a periodontite, a fosfatase alcalina é uma glicoproteína na barreira da membrana, produzida por muitas células, como os leucócitos, osteoblastos, macrófagos e fibroblastos. As bactérias presentes no sulco ou na bolsa periodontal também produzem ALP e contribuem para o aumento do nível de ALP no FCG. Foi encontrada uma correlação positiva entre o nível de ALP no FCG de locais com periodontite ativa e locais com periodontite inativa. Contudo, o nível de ALP no FCG, como um biomarcador de diagnóstico da doença periodontal, é limitado.
- Beta-Glucoronidase (BG)- Chung *et al.* (1997) relataram que a atividade da enzima BG deve ser um bom indicador ou precursor da doença periodontal, uma vez que essa enzima contribui para degradação da matriz colágena na doença periodontal.
- Elastase- A elastase neutrofílica é uma protease armazenada nos grânulos primários de granulócitos neutrofílicos, onde degrada elastina e outras proteínas funcionais e estruturalmente importantes do periodonto, incluindo colagénio, proteoglicano e alguns componentes da membrana. A elastase liberada no tecido é normalmente inibida em milésimos de segundo por dois inibidores abundantes a anti- tripsina-1 ( $\alpha$ -1 AT) e a macroglobulina-2 ( $\alpha$ -2 MG). A  $\alpha$ - 1 AT é o inibidor mais abundante da protease detectável nas amostras de FCG e sua função

primária é no controle da atividade da elastase do neutrófilo. Amostras de  $\alpha$ -1 AT é geralmente suficiente para controlar toda atividade de proteases livres (Figueredo *et al.*, 1998).

Jin *et al.* (1995) realizaram um estudo com objetivo de monitorar a resposta do local específico da terapia periodontal com manutenção regular ao longo de cinco anos num determinado grupo selecionado de pacientes com periodontite severa destrutiva. Granulócitos elastase foram avaliados em quatro tipos de locais. Os autores relataram que elastase no FCG esta associada com inflamação periodontal e pode potencialmente indicar o nível de doença no local específico. Foram selecionados treze pacientes com periodontite severa destrutiva, 62 locais foram classificados de acordo com os diferentes parâmetros, profundidade de bolsa, altura óssea antes e depois de manutenção de cinco anos.; 17 locais são sem nenhuma mudança de profundidade de bolsa e perda óssea; 6 locais inicialmente são, com deterioração na profundidade de bolsa e perda óssea; 14 locais doentes, com progressão na profundidade de bolsa e perda óssea; 25 locais doentes, sem profundidade de bolsa e perda óssea. O FCG foi coletado pelo método bomba intracrevicular. A atividade elastase foi avaliada com um substrato específico para granulócito elastase de pequeno peso molecular; os grãos de elastase foram também avaliados. A significância de diferentes valores de parâmetros clínicos e atividade das enzimas foram testados com ANOVA entre as quatro categorias de locais no inicio ou depois de cinco anos. Os locais com progressão do aumento da profundidade de bolsa e perda óssea e locais doentes sem perda óssea e profundidade de bolsa apresentaram aumento significantes de células de elastase confinada em grãos do que em locais saudáveis. Também foi notado, através da análise da correlação, que a atividade elastase aumenta com inflamação periodontal e destruição. O presente resultado demonstrou que o nível de elastase variou com o progresso do estado clínico no nível do local. Foram encontradas diferenças significantes no nível de elastase que existiram entre locais doentes com nenhum envolvimento com ou sem hemorragia à sondagem. Estes resultados suportam a idéia prévia de que a ausência de hemorragia à sondagem deve ser um indicador de estabilidade periodontal. Um aumento do nível de elastase está associado com a progressão da doença e deve ser usado para monitorar a resposta de uma terapia longitudinal de manutenção.

Figueredo *et al.* (1998) estudaram a presença de elastase livre no FCG de 12 pacientes com gengivite e 19 pacientes com periodontite com e sem destruição. Foram investigadas a distribuição e a atividade de elastase no FCG. Neste estudo, a atividade elastase foi avaliada com pequeno peso molecular, substrato fortemente específico para grânulos de elastase. Para diferenciar a atividade de elastase livre e elastase retida por  $\alpha$ -2 MG, uma quantidade excessiva de  $\alpha$ -1 AT foi adicionada nas amostras. A  $\alpha$ -1 AT é um inibidor muito eficaz da atividade de elastase livre, mas não pode inibir atividade do complexo elastase  $\alpha$ -2 MG. O estudo mostrou que a quantidade total de elastase neutrofílica é significativamente maior nos locais com destruição tecidual. Figueredo elucidou que a quantidade total de elastase é, significativamente, maior nos locais com destruição tecidual, ou seja, a atividade elastase neutrofílica está associada com a destruição tecidual, e foi encontrada uma grande quantidade de elastase livre, elastase do complexo  $\alpha$ -2MG nos locais com destruição, mas não houve diferença nas amostras do complexo elastase  $\alpha$ -1 AT. O elevado nível de elastase livre nos locais com destruição deve ser consequência da combinação do aumento da liberação de elastase e inativação de  $\alpha$ -IAT. Concluindo que a análise da presença de elastase livre no FCG de locais inflamados com e sem destruição tecidual teve como resultado grande concentração de atividade protease livre nas amostras de FCG de locais com destruição tecidual detetável, e consequentemente pouca atividade collagenase é encontrada no FCG de periodonto saudável.

Figueredo *et al.* (1998) avaliaram a atividade de prótease livre no FCG de locais inflamados com ou sem destruição. Dezenove pacientes com locais com periodontite e gengivite e doze somente com gengivite foram avaliados. O método de obtenção utilizado foi bomba intracrevicular, o que não avalia o volume. O estudo mostrou protease livre na amostra de FCG de locais com e sem destruição. Os autores relataram uma atividade protease bastante grande nos locais com bolsas profundas em comparação com bolsas rasas no mesmo paciente. Uma grande variação de atividade protease foi notada nas três categorias de locais. A origem da atividade protease não pode ser estabelecida com método usado, mas a adição de  $\alpha$ -1 AT indica que a contribuição das proteases insensíveis ao inibidor com  $\alpha$ -1 AT é limitada.

Alpagot *et al.* (2001) relataram que o elevado nível da enzima elastase no FCG foi encontrado em locais com doença periodontal. Essa enzima é liberada pelos

polimorfonucleares para o sulco gengival como resultado da interação do hospedeiro e microbiota.

- Catepsina B- Chen *et al.* (1998) realizou um estudo sobre o nível da catepsina no FCG e constataram que o o nível da catepsina pode ser usado como um indicador da perda de ligamento e também como um indicador no prognóstico na doença periodontal. Um nível elevado de catepsina foi encontrado em pacientes com periodontite, há uma direta correlação com a severidade da doença periodontal.
- Matriz metaloproteinase (MMPs) - são uma família de enzimas responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular como o colagénio, proteoglicano, laminina, elastina e fibronectinas. Essas enzimas tem um papel fundamental na remodelação do ligamento periodontal tanto em condições fisiológicas como em condições patológicas. MMP-8, MMP-9 e granulócito elastase funcional estão envolvidos na destruição tecidual nos casos de doença periodontal, a placa bacteriana induz o infiltrado inflamatório inicial no sulco gengival incluindo macrófagos e linfócitos. Esse ativado inflamatório celular produz mediadores inflamatórios, os quais estimulam a produção de MMPs através dos fibroblastos, células epiteliais e PMNs (Söder *et al.*, 2002).

Hernandez *et al.* (2006) realizaram uma pesquisa para verificar a presença de MMP-13 em amostras de FCG de pacientes com atividade de periodontite crónica (locais ativos e inativos). E verificaram que a atividade de MMP-13, no FCG, foi significativamente maior em locais ativos para periodontite progressiva, devido ao seu papel na perda óssea alveolar.

#### 2.5.2.2 Mediadores inflamatórios e modificadores da resposta do hospedeiro

Mediadores inflamatório e modificadores da resposta do hospedeiro
Prostaglandina E2
PA
Platelet-fator de ativação
SP
PAI-2
Calgranulina A (MRP-8)

Neoptarina
Peptídeo intestinal vasoactivo
Neuroquinina A
CD14
Cistatinas
TNF- $\alpha$ ,
MCP-1
Anticorpos anti-bacterianos: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA
Quimiotáticos e ativadores de macrófagos e linfócitos.
Leucotrieno B4
Lactoferrina, transferrina, $\alpha$ 2-macroglobulina, $\alpha$ 1-inibidor proteinase, proteína-C reativa
Citocinas: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8

Tabela 3- Mediadores inflamatórios e modificadores da resposta do hospedeiro  
(Adaptada de Alrowis, 2014)

Figueredo *et al.* (1999) estudaram a hipótese do nível de IL1-  $\beta$  no FCG como característica marcante da periodontite independentemente do nível de destruição. Foram coletadas amostras de FCG de locais inflamados com bolsas periodontais não profundas e bolsas profunda em dezoito pacientes e treze pacientes com apenas gengivite. O estudo mostrou que a concentração de IL1- $\beta$  no FCG é maior em pacientes periodontais somente quando bolsas periodontais não profundas são comparadas com pacientes com apenas gengivite. Não houve diferença significativa na concentração de IL 1- $\beta$  entre bolsas periodontais não profundas e profundas no mesmo paciente. Os valores similares no volume de FCG e concentração de elastase  $\alpha$ -1 AT,  $\alpha$ -2 MG indicou que o nível de inflamação local foi o mesmo nas três categorias. Isto suporta a hipótese de que IL1- $\beta$  é mais característica de um paciente individual, paciente propenso, e um menor resultado do estado clínico da amostra do sítio. Somente uma pobre correlação entre IL 1 -beta e elastase foi notada no presente estudo. Provavelmente porque a ativação e a degranulação dos neutrófilos são influenciadas por muitas substâncias no tecido inflamado. No estudo presente não foi encontrada diferença significativa na concentração da elastase, medida funcional e imunologicamente nos dois grupos. Neste estudo foram utilizadas tiras de papel. Os níveis de IL1- $\beta$  no FCG foi maior em amostras de pacientes periodontais, sem relação com severidade da doença no sítio coletado, sugerindo que o nível da IL1- $\beta$  é típico da propensão de cada paciente.

As citocinas são importantes moduladores do periodonto, tanto no periodonto são como no processo patológico do periodonto. A análise do nível de produção de

citocinas também foi usada como uma ferramenta para o estudo da resposta local do hospedeiro ao desafio bacteriano. As citocinas presentes no FCG têm sido propostas como um potencial marcador para o diagnóstico e prognóstico da destruição periodontal. Entre eles, a interleucina (IL) 1 $\beta$ , IL-4 e IL-8 atuam em conjunto com outros membros da rede de citocinas para regular a resposta inflamatória no periodonto (Alrowis *et al.*, 2014).

- Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina pró-inflamatória que geralmente encontrada na periodontite e é responsável pela reabsorção óssea alveolar durante a periodontite (Stashenko *cit. in* AlRowis et al., 2014).

### 2.5.2.3 Produtos da destruição tecidual

Laminina
Osteopontina
Osteocalcina
Calprotectina
Fibronectina fragmentos
Hemoglobina $\beta$ - peptídeos de cadeia
Chondroitina 4-sulfato
Chondroitina 6-sulfato
Ligações cruzadas de Piridonolina (ICTP)
GAG's
Osteonectina, ácido hialurônico, hidroxiprolino

Tabela 4- Produtos de destruição tecidual – (Adaptada de Alrowis, 2014)

- Laminina- Figueredo *et al.* (2000) fizeram um estudo com o objetivo de comparar níveis de laminina e interleucina-8 (IL-8) no FCG de locais inflamados sem bolsa gengivite, e bolsas profundas (periodontite) e pacientes com periodontite com níveis do FCG em locais com bolsas rasas em pacientes com apenas gengivite. A primeira hipótese deste estudo foi com o objetivo de mostrar a presença de uma quantidade maior de neutrófilos ativados em locais inflamados através da avaliação do dano causado por estas células na membrana basal durante a transmigração do endotélio/ epitélio. Para avaliar este dano da membrana basal, amostra de laminina no FCG foi quantificada com ELISA; e foi correlacionada amostra de laminina com lactoferrina que é uma proteína armazenada no grânulo secundário de neutrófilo usado como marcador para o número destas células. E também foi analisado IL-8, procurando explicar diferenças na destruição tecidual entre locais com mesmos sinais clínicos de inflamação. IL-8 é uma citocina pequena que mostra atividade quimiotática

resistente aos neutrófilo, mas não aos monócitos; e também age como ativador de neutrófilo. Em grandes amostras de IL-8 de locais inflamados parece que aumenta o número de neutrófilo bem como induz uma grande ativação local. A segunda hipótese foi de correlacionar a destruição da membrana basal com o nível de IL-8 no local. Os autores analisaram um grupo com periodontite em treze pessoas tendo no mínimo seis locais com profundidade de bolsa maior que 5 mm; e um grupo de controle saudável com doze pacientes sem nenhum sinal clínico de destruição periodontal. FCG foi coletado com tiras de papel e o volume foi avaliado rapidamente após a coleta. No presente estudo, foi encontrada grande quantidade de laminina no FCG de pacientes com periodontite adulta, sugerindo a presença de células ativadas durante a transmigração pela membrana basal, ou seja, uma hiperatividade neutrofílica durante o processo de transmigração endotélio/epitélio. A diferença foi maior quando comparados os locais com periodontite e apenas gengivite, mas teve também uma tendência pra diferenciar os locais com gengivite e apenas gengivite. Contudo não houve evidência na correção entre IL-8 e diferenças de locais específicos na destruição tecidual.

Na cavidade oral, a lamina é expressa principalmente nas células epiteliais, as quais estimulam a migração de células epiteliais na formação das bolsas periodontais na progressão da periodontite, acredita-se ser um fator chave na migração apical de células epiteliais (Pöllänen *et al.*, 2003).

- Osteopontina (OPN) é a principal fosfoproteína glicosilada na matrix óssea e é produzida por muitas células como os osteoblastos, osteoclastos e macrófagos. Foi demonstrado um aumento no nível de OPN no FCG na periodontite e uma redução desse nível depois do tratamento periodontal (Sharma *cit. in* AlRowis *et al.* 2014).
- Osteocalcina (OC) é produzida pelos osteoblastos e tem sido descrita como o marcador mais específico na função dos osteoblastos. Foi encontrado no FCG de pacientes com doença periodontal e o nível aumentado da concentração de OC no FCG foi associado com altas taxas de remodelação óssea. Elevados níveis de OC no FCG são reportados na periodontite do adulto e deve ser relacionado com a severidade da destruição e/ou reparação do osso alveolar. Durante a reabsorção ativa do osso, OC e fragmentos de OC são susceptíveis de ser liberados da matrix extracelular para o FCG. Nakashima *cit. in* AlRowis *et al.* 2014 afirmou

que a concentração média de OC no FCG foi dez vezes maior do que a encontrada no plasma e especulou que o OC foi produzido localmente pelos tecidos periodontais.

Muitas pesquisas sobre o nível de OC no FCG de pacientes periodontais tem sugerido que o nível de OC no FCG deve refletir inflamação nos locais com doença periodontal e tem sido de interesse recente o OC como um potencial marcador da remodelação óssea na doença periodontal (Bullon *et al.*, 2005 e Alrowis *et al.*, 2014).

### **2.5.3 Indicadores da Progressão da doença**

Gustafsson *et al.* (1994) estudaram o balanço entre a atividade de elastase neutrofílica e  $\alpha$ 2-MG no FCG; e também elucidou algumas características distintas da reação inflamatória, destruição tecidual, na patogênese da doença periodontal. Foi realizado um estudo em três categorias: seis locais em pacientes com gengivite, seis locais em pacientes com peri-implantite com perda do ligamento periodontal e seis locais sem destruição com periodontite. O método de coleta utilizado foi tiras de papel (Periopaper®). Os achados mostram que a grande solução de atividade de elastase é associada com a destruição tecidual e tem uma relevância óbvia patogênica. Um aumento na atividade de elastase pode ser associado ao aumento na concentração de granulócitos ou aumento da liberação da elastase pelos granulócitos. Um aumento da liberação de elastase junto com radicais livres de oxigênio dos granulócitos periféricos e uma possível associação constitucional foi encontrada em periodontite juvenil. As duas variáveis utilizadas nesse estudo, profundidade de bolsa e perda do ligamento não distinguem entre locais inflamados provenientes de pacientes com gengivite e locais inflamados sem perda de ligamento de pacientes periodontais. A destruição periodontal tecidual é associada com aumento nos níveis da atividade elastase e diminuição no nível de  $\alpha$ 2-MG. Os achados aumentaram o suporte da tese um envolvimento da atividade dos granulócitos na periodontite. Os autores relataram que a avaliação da elastase e  $\alpha$ 2-MG deve ser usada como um instrumento pra distinção entre gengivite e periodontite em estágio inicial e para indicar atividade da doença, antes dos sinais visíveis de destruição terem ocorrido.



Gustafsson *et al.* (1994) realizaram outro estudo com o objetivo de avaliar os níveis de elastase e lactoferrina no FCG, a fim de determinar uma diferença na reação inflamatória entre pacientes com gengivite e pacientes periodontais. Foram analisados locais com gengivite, locais com periodontite com e sem perda do ligamento. Então a comparação dos locais mostrou um aumento da atividade elastase em pacientes periodontais maior do que em pacientes com apenas gengivite. O experimento de degranulação mostrou que a liberação completa de lactoferrina ocorreu durante os cinco primeiros minutos de estimulação. Em contraste, a liberação de elastase foi tempo dependente e continuou ao longo do período de estimulação. Os resultados confirmaram a ocorrência de degranulação sequencial dos granulócitos, onde indica um grupo independente de controle da liberação desses dois tipos de grânulos. Amostras de lactoferrina não diferem significativamente entre os três tipos de locais e o teste de correlação mostrou que amostra de lactoferrina, ao contrário da atividade elastase, não foi relatada no local de doença severa. Os autores sugerem que lactoferrina no FCG pode ser usada para medir o número de granulócitos atraídos para o sítio pela carga de bactérias; em contraste a liberação de elastase foi tempo-dependente e continuou ao longo do período de estimulação. Esses resultados confirmam a ocorrência de degranulação sequencial de granulócitos o que indica controle independente da liberação destes dois tipos de grânulos. Os autores indicam a lactoferrina como um marcador seguro do número de granulócitos, isto significa que três tipos de locais contem número similar de granulócitos. A diferença na atividade elastase entre os locais sem destruição fica sempre quando a atividade elastase for relatada para o número de granulócitos expressos pela lactoferrina. De acordo com estudo anterior foi observado que lactoferrina não aumentou de volume proporcionalmente ao FCG; houve um aumento da amostra de laminina no FCG de pacientes com periodontite, o autor sugere uma hiperatividade neutrofílica durante o processo de transmigração do endotélio para epitélio, e nenhuma evidência foi encontrada na correlação entre IL-8 e destruição tecidual.

Então, o estudo mostrou um aumento da concentração da actividade elastase de granulócitos no FCG de locais sem destruição, de pacientes periodontais, quando comparados com locais inflamados em pacientes com gengivite, com a mesma severidade da doença, usando os parâmetros clínicos (sondagem, nível clínico de inserção). O número de granulócitos, medidos pela lactoferrina, não difere significativamente entre estes dois tipos de locais para explicar a variação. A explicação mais provável é um aumento da

liberação de elastase por célula, devido a uma resposta do hospedeiro aberrante dos pacientes com periodontite. A presente investigação mostra um aumento da concentração da actividade da elastase de granulócitos em locais inflamados de FCG sem destruição em pacientes com periodontite. Esses achados indicam que deve ser possível desenvolver métodos para distinguir periodontite destrutiva e gengivite não destrutiva antes da perda do ligamento ser detectada clinicamente.

### 3. DISCUSSÃO

A Periodontite é uma doença multifatorial, a presença das bactérias patogênicas é necessária mas não suficiente, pois estudos desmostraram uma mudança no paradigma da doença periodontal. Estes estudos mostram que os microrganismos associados a doença periodontal também são encontrados em locais sãos ou locais sem progressão da doença. A imunidade do hospedeiro e a resposta inflamatória contra o desafio da microbiota é um determinante crítico da suscetibilidade à periodontite e, junto com a influência comportamental, o meio oral e os fatores genéticos. Os locais periodontais sãos são caracterizados pela presença da placa bacteriana, composta principalmente por microrganismos gram-positivos. Nesta situação o FCG representa um exsudato do soro, fluindo dos tecidos gengivais para o sulco gengival. Na maioria dos tecidos gengivais, mesmo sãos, há uma leve inflamação devido a constante presença de placa bacteriana. Até na gengiva saudável, há um infiltrado de leucócitos que é predominantemente neutrófilos e leucócitos polimorfonucleares (Champagne *et al.*, 2003).

Na gengivite há uma mudança na composição da placa, com o aumento da presença de microrganismos gram-negativos, os quais induzem a resposta do hospedeiro, causando eritema, edema, hemorragia à sondagem. Devido ao acúmulo de fluidos nos tecidos, inicia-se a infiltração celular e assim, a gengivite clínica (Champagne *et al.*, 2003). A formação do biofilme na superfície dos dentes adjacentes aos tecidos gengivais, promove o contato das células do epitélio do sulco e do epitélio juncional com produtos residuais, enzimas, e componentes das bactérias em colonização. As células epiteliais, ativadas por substâncias microbianas, produzem citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores químicos da inflamação (Gemmel *et al.*, 1997). Esses mediadores induzem uma resposta inflamatória no interior dos tecidos gengivais, que acompanha a via clássica de inflamação.

Na gengivite, a resposta dos neutrófilos é predominante, incluindo leucotrienos B4, tromboxano, collagenase (MMP's). Na gengivite existem pequenas quantidades de interleucina -1 ou fator de necrose tumoral, o que indica um nível baixo de células associadas com inflamação crônica. Na periodontite há a colonização profunda de bactérias gram-negativas no sulco e com isso há a propagação de uma resposta crônica inflamatória. Os lipopolissacarídeos penetram nos tecidos, estimulando os monócitos os quais secretam mediadores de inflamação, incluindo prostaglandinas E2, tromboxano B2, interleucinas (-1, -6, -8), fator de necrose tumoral e collagenase. Estes mediadores inflamatórios ativam as células do músculo liso, fibroblastos, mais monócitos e osteoclastos para produzir MMPs e estimular a reabsorção óssea. Esta cascata da inflamação produz inicialmente uma inflamação clínica, perda do inserção, bolsas e perda óssea (Champagne *et al.*, 2003).

A importância do FCG tem sido reconhecida há várias décadas, desde 1960, quando pela primeira vez foi sugerido a análise do FCG como um meio de avaliar o estado inflamatório da gengiva e dos tecidos periodontais (Armitage, 2004).

A coleta do FCG é um procedimento minimamente invasivo, e a análise de constituintes específicos do FCG fornece um valor quantitativo do indicador bioquímico, para a avaliação do metabolismo celular local, o que reflete o estado de saúde periodontal do paciente (Champagne *et al.*, 2003).

A avaliação do FCG é influenciada pela técnica de obtenção e manipulação laboratorial. Existem três métodos de obtenção disponíveis: tubos capilares, bomba gengival e tiras de papel (Gustafsson, 1996).

As tiras de papel são mais usadas, o uso de tiras de papel envolve risco na recuperação de várias proteínas, visto que é impossível medir a atividade elastase no FCG obtido através de tiras de papel sem destruir os neutrófilos e alterar a permeabilidade das membranas celulares. A bomba gengival não causa trauma significativo nos vasos sanguíneos, mas não permite mensuração do volume, o qual é necessário para ressaltar a influência do volume no fundo de bolsas periodontais. Já os tubos capilares permitem avaliação do volume, mas o colhimento prolongado resulta num trauma considerável (Gustafsson, 1996).

O método mais comum é a utilização de tiras de papel (Periopaper®), que permite análises específicas. A maioria dos estudos utilizam as tiras de papel por trinta segundos no

sulco gengival, medem a quantidade total do FCG coletado por eluição, que é a separação da parte absorvida, e em seguida é feito um ensaio do marcador específico, por exemplo ELISA. Outros estudos coletam o FCG com tiras de papel e depois avaliam a quantidade de FCG obtida com o Periotron®, o qual mede o volume de FCG. A escolha do métodos de avaliação depende do estudo a ser realizado, se o objetivo for em marcadores de inflamação de tecidos, o método de concentração é o de escolha por alguns pesquisadores, pois é independente da profundidade da bolsa e, por comparação com amostras de tecido de biópsia, adjacentes, parece reflectir os níveis nos tecidos por difusão a partir de um nível elevado no interior tecidual a um nível inferior no interior do compartimento do sulco gengival (Barros *et al.*, 2016).

Alguns componentes de FCG vêm sendo analisados ao longo dos anos, devido a sua significância clínica e seu possível uso como parâmetro de diagnóstico para periodontite e peri-implantite. Os componentes do FCG são derivados principalmente do soro, células estruturais do periodonto, células inflamatórias e imunes do tecido conjuntivo, epitélio e sulco gengival e também bactérias sub-gengivais. A produção do FCG está associada à microligação do plexo vascular gengival, a característica precoce da resposta inflamatória é a permeabilidade vascular. O FCG contém uma população de células imunes que variam de acordo com a severidade da inflamação de tecido periodontal (Takeuchi *et al.*, 1991).

Estipula-se mais de noventa componentes diferentes no FCG já foram identificados na doença periodontal. Com o avanço das técnicas laboratoriais, o FCG tem sido eluído e extensivamente analisado para verificar a presença dos fatores de resposta do hospedeiro, incluindo moléculas sanguíneas, tecidos do hospedeiro e biofilme bacteriano.

A MMPs são parte de um grupo importante de proteinases que são associados com a degradação de colagénio durante a doença periodontal, e podem ser identificados no FCG. Os neutrófilos são uma importante fonte de MMPs, especialmente MMP-8 e MMP-9, nos locais infectados. Os macrófagos são ativados, em resposta ao lipossacarídeo bacteriano, a produzir importantes mediadores inflamatórios como o TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1, outras citocinas relacionadas a resposta do hospedeiro e a destruição tecidual (Gemmell *et al.*, 1997; Barros *et al.*, 2016).

Ingman *et al.* (1994) relatam que algumas enzimas proteolíticas participam da degradação fisiológica e remodelação bem como destruição patológica da matriz protéica

extracelular de tecidos conjuntivos. Algumas destas proteinases neutrófilo (MMP-8) e fibroblasto tipo (MMP-1) collagenases intertissuais são as chaves iniciais da degradação do tecido conjuntivo.

O mesmo autor também em 1994, realizou uma pesquisa com o objetivo de determinar a diferença da reação inflamatória entre pacientes com gengivite apenas e periodontite, avaliando os níveis de elastase e lactoferrina. Os resultados mostraram um aumento da atividade granulócito elastase no FCG de locais inflamados sem destruição em pacientes periodontais, quando comparados com locais inflamados em pacientes com apenas gengivite. O número de granulócitos medidos através de lactoferrina não difere significativamente entre os dois tipos de locais. O autor sugere que é possível identificar a periodontite ativa antes da perda de ligamento periodontal.

Posteriormente, em 1995 Gustafsson relatou que a concentração de proteínas, em geral, é primariamente dependente do tipo de paciente, diagnosticado com gengivite ou com periodontite. O mecanismo responsável pela diminuição da concentração de proteína no FCG em pacientes com periodontite pode ser dificilmente explicado somente por um aumento no consumo da quantidade total de proteínas pela inflamação destrutiva. Estas discrepâncias indicam uma possibilidade de identificação precoce de pacientes com risco de periodontite.

Gustafsson (1998) realizou estudo que não identificou nenhuma relação entre a concentração de laminina e lactoferrina, para auxiliar no prognóstico da patologia periodontal. Em contraste, Figueredo (2000) teve como resultado de seu estudo uma grande amostra de laminina em pacientes com periodontite adulta. O mesmo autor avaliou a degradação da membrana basal pela mensuração de amostras de laminina no FCG com objetivo de estimar atividade neutrofílica nos tecidos gengivais, secundariamente foi avaliada a correlação do nível de interleucinas no local de destruição da membrana basal. A elastase neutrofílica parece estar associada com destruição tecidual como foi relado num estudo prévio do mesmo grupo de pesquisadores. Não houve diferença significativa na concentração de elastase medida funcional e imunologicamente nos dois grupos. A razão para esta discrepância é provavelmente o método de obtenção do FCG, que foi tiras de papel.

Estudos examinando a relação dos marcadores de atividade celular e inflamatório, presentes no FCG, têm promovido um aumento no entedimento da patogênese da doença, isto é, na progressão da doença periodontal.

Taylor e Preshaw (2016) abordaram a função dos elementos do FCG e saliva, e como estes elementos interagem com células do hospedeiro e patógenos, e descreveram como a identificação destes biomarcadores dentro destes fluidos orais devem ter benefícios na saúde oral. É crítico que esse campo deve ser sustentado pela complexidade da microbiota oral e também por células imunológicas, para se entender a defesa do hospedeiro e a reparação tecidual e regeneração. Uma clara exposição das abordagens metodológicas, cuidadosa seleção e calibração das ferramentas de análise e um desenho experimental apropriado e análise são essenciais. Os autores descrevem alguns desafios: ainda não é totalmente claro alguns fatores: como pacientes fumadores e doenças sistêmicas, por exemplo diabetes, achados bioquímicos e componentes celulares dos fluidos orais e consequentemente a utilização deles no diagnóstico periodontal e a monitorização. Uma vez essa complexidade compreendida e superado os desafios técnicos, então a análise dos fluidos orais podem significativamente aumentar o controle da doença periodontal. Amostra de saliva é particularmente eficaz e aceitável em pacientes e junto com o desenvolvimento das técnicas têm o potencial de ser um precursor de uma nova etapa no tratamentos periodontais.

O estudo dos mediadores no FCG é promissor, pois representa uma ferramenta importante para a monitorização da doença periodontal e também pelo potencial preditivo, pois permite verificar o risco de uma futura doença. Esta área de diagnóstico oral cresceu muito no intuito de desenvolver ferramentas para a monitorização da doença periodontal e com isso vem sendo desenvolvido análises sofisticadas de suscetibilidade genética e ensaios moleculares para a detecção de biomarcadores nos diferentes estágios da doença periodontal, melhoramentos substanciais têm sido desenvolvidos para um melhor entendimento dos mediadores presentes na iniciação e progressão da periodontite. Avanços na tecnologia microfluídica estão revolucionando os procedimentos de biologia molecular para análise enzimática, análise de DNA e proteômica. A evolução da microfluídica, microfluídica digital parece promissora para aplicação futura de diagnosticar doenças periodontais e prognosticar o tratamento periodontal (Taba *et al.*, 2005; Barros *et al.*, 2016).

### **III. CONCLUSÃO**

De acordo com a literatura revisada, pode-se concluir que alguns biomarcadores encontrados no FCG têm algum potencial no estudo da progressão da doença periodontal, mas os mais promissores são os produtos de destruição tecidular (tabela 4). Estes marcadores que refletem a degradação do osso, em particular a Condroitina-4 sulfato, que é uma glicosaminoglicana ósseo-específica. A piridinolina (ICTP), que é um produto da degradação óssea foi preliminarmente examinado como um biomarcador na progressão da periodontite. No entanto, estudos longitudinais são necessários para determinar o quanto o nível desses marcadores pode refletir no risco para a progressão da periodontite. Ambos os marcadores têm considerável peso para esse propósito, uma vez que eles são relativamente ósseo-específicos (Armitage, 2004).

No entanto, estudos mais recentes demonstraram que que níveis combinados de elastase, MMP-8 e sialidase ajudaram a prever o tratamento periodontal convencional num determinado sítio (Gul *et al.*, 2016).

Acredita-se que o conhecimento dos biomarcadores presentes no FCG, junto com os elementos celulares, podem auxiliar no diagnóstico precoce da doença periodontal e consequentemente, monitorar a progressão da doença periodontal. O FCG é também importante, pois possui um valor predictivo, ou seja, permite identificar o risco de doença futura. Isso é importante pois permite identificar os pacientes que precisam de um maior acompanhamento e prevenção da doença periodontal, o que no futuro levará a um novo paradigma no plano de tratamento periodontal (Chibebe, P. C. *et al.*, 2008; Cafiero e Matarasso, 2016).

#### **IV. BIBLIOGRAFIA**

AlRowis, R.; et al (2014). Oral Fluid-Based Biomarkers in Periodontal Disease- Part 2. Gingival Crevicular Fluid. *Journal of International Oral Health*, 6(6), pp. 126-135.

AlMoharib, H. S. et al (2014). Oral Fluid-Based Biomarkers in Periodontal Disease- Part 1. Saliva. *Journal of International Oral Health*, 6(7), pp. 95-103.

Alpagot, T.; et al (2001). Crevicular fluid elastase levels in relation to periodontitis and metabolic control of diabetes. *Journal of Periodontal Research*, 36(3), pp. 169-174.

Armitage, G. C. (1999). Development of a classification system for periodontal disease and conditions. *American Academy of Periodontology*, 4(12), pp. 1-6.



- Armitage, G. C. (2004). Analysis of gingival crevice fluid and risk of progression of periodontitis. *Periodontology 2000*, 34(1), pp. 109-119.
- Barros, S. P.; et al (2016). Gingival crevicular fluid as source of biomarkers for periodontitis. *Periodontology 2000*, 70(2), pp. 53-64.
- Bullon, P.; et al (2007). Osteocalcin in serum, saliva and gingival crevicular fluid: Their relation with periodontal treatment outcome in postmenopausal women. *Medicina Oral Patologia Oral y Cirurgia Bucal*, 12(3), pp. 193–197.
- Cafiero, C. e Matarasso, S. (2016). Predictive, preventive, personalised and participatory periodontology: “the 5Ps age” has already started. *EPMA Journal*. [Em linha]. Disponível em [http:// www.epmajournal.com/content/4/1/16](http://www.epmajournal.com/content/4/1/16). [Consultado em 4/05/2016].
- Carranza Jr, F. A. e Neuman, M. G. (1996). *Periodontia Clínica*. 8<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Champagne, C. M. E.; et al (2003). Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 31(2), pp. 167-180.
- Chen, H. Y., Cox, S. W. e Eley, B. M. (1998). Cathepsin B, alpha2-macroglobulin and cystatin levels in gingival crevicular fluid from chronic periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(1), pp. 34–41.
- Chibebe, P. C.; et al (2008). Uma visão atual do FCG como método de diagnóstico periodontal. *Revista Científica Médica de Campinas*, 17(12), pp. 167-173.
- Christodoulides, N.; et al (2005). Application of microchip assay system for the measurement of C-reactive protein in human saliva. *Lab on a Chip*, 5(3), pp. 261–269.
- Chung, R. M., Grbic, J. T. e Lamster, I. B. (1997). Interleukin-8 and beta-glucuronidase in gingival crevicular fluid. *Journal of Clinical Periodontology*, 24(3), pp. 146–152.
- Costa, P. P. (2012). *Biomarcadores diagnósticos relacionados à atividade da doença periodontal em diabéticos*. Dissertação (doutorado em periodontia) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

Figueredo, C. M. S. e Gustafsson A. (1998). Activity and inhibition of elastase in GCF. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(7), pp. 531-535.

Figueredo, C. M. S. e Gustafsson A. (1998). Protease activity in gingival crevicular fluid: Presence of free protease. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(4), pp. 306-310.

Figueredo, C. M. S. e Gustafsson A. (2000). Increased amounts of laminin in GCF from untreated patients with periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 27(5), pp. 313-318.

Figueredo, C. M. S.; et al (1999). Increased Interleukin 1 $\beta$  concentration in gingival crevicular fluid as a characteristic of periodontitis. *Journal of Periodontology*, 70(12), pp. 1457-1463.

Figueredo, C. M. S.; et al (2004). The short term effectiveness of non surgical treatment in reducing protease activity in gingival crevicular fluid from chronic periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(8), pp. 615-619.

Gemmell, E., Marshal, R. I. e Seymour, G. J. (1997). Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontology 2000*, 14(6), pp. 112-143.

Genco, R. J. (1992). Host response in periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 63(4), pp. 338-355.

Goodson, J. M. (2003). Gingival crevice fluid flow. *Periodontology 2000*, 31(1), pp. 43-54.

Groenink, J.; et al (1999). Salivary lactoferrin and low-Mr mucin MG2 in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 26(5), pp. 269-75.

Guentsch, A.; et al (2011). Comparison of Gingival Crevicular Fluid Sampling Methods in Patients with Severe Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 82(7), pp. 1051-1060.

Gul, S. S.; et al (2016). A pilot study of active enzyme levels in gingival crevicular fluid of patients with chronic periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 10(4), pp. 1-8.

Gustafsson, A. (1996). Methodological considerations in GCF sampling with paper strips: poor recovery of uncomplexed elastase. *Journal of Clinical Periodontology*, 23(5), pp. 432-436.

Gustafsson, A., Asman, B. e Bergström, K. (1994). Altered relation between granulocyte elastase and  $\alpha$ -2 macroglobulin in gingival crevicular fluid from sites with periodontal destruction. *Journal of Clinical Periodontology*, 21(1), pp. 17-21.

Gustafsson, A., Asman, B. e Bergström, K. (1994). Elastase and lactoferrina in gingival crevicular fluid: possible indicator of granulocyte-associate specific host response. *Journal of Periodontal Research*, 29(7), pp. 276-282.

Gustafsson, A., Asman, B. e Bergström, K. (1995). Lower protein concentration in GCF from patients with periodontitis: an indicator of host-specific inflammatory reaction. *Journal of Clinical Periodontology*, 22(3), pp. 225-228.

Hernandez, M.; et al (2006). Matrix Metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. *Journal of Periodontology*, 77(11), pp. 1863-1870.

Ingman, T.; et al (1994). Collagenase, gelatinase, and elastase activities in sulcular fluid of osseointegrated implant and natural teeth. *Journal of Clinical Periodontology*, 21(4), pp. 301-307.

Ishikawa, I. (2007). Host responses in periodontal diseases: a preview. *Periodontology* 2000, 43(2), pp. 9-13.

Jin, L. J.; et al (1995). Granulocyte elastase in Gingival Crevicular Fluid: improved monitoring of the site-specific response to treatment in patients with destructive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 22(3), pp. 240-246.

Kinane, D. F. (2001). Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology* 2000, 25(2), pp. 8-20.

Lindhe, J. (2005). *Tratado de Periodontia Clínica e Implantodologia Oral*. 5ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

McLaughlin, W. S.; et al (1996). Human gingival crevicular fluid keratin at healthy, chronic gingivitis and chronic adult periodontitis sites. *Journal of Clinical Periodontology*, 23(4), pp. 331–335.

Miller, C. S.; et al (2006). Salivary biomarkers of existing periodontal disease: a cross-sectional study. *The Journal of American Association*, 137(3), pp. 322-329.

Monteiro, A. M. (2010). *Influência do tratamento periodontal sobre os marcadores de risco para aterosclerose em pacientes com periodontite crônica*. Dissertação (doutorado em ciências biomédicas) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nagler, R. M.; et al (2001). New insights into salivary lactate dehydrogenase of human subjects. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 137(5), pp. 363-369

Nomura, Y.; et al (2012). Salivary biomarkers for predicting the progression of chronic periodontitis. *Archives of Oral Biology*, 57(4):413–420.

Ozmeric, N. (2004). Advances in periodontal disease markers. *Clinica Chimica Acta*, 343(2), pp. 1-16.

Page, R. C. e Eke, P. I. (2007). Case definition for use in Population-Based surveillance of periodontitis. *Journal of Periodontology*, 78(7), pp. 1387-1399.

Pöllänen, M. T., Salonen, J. I. e Uitto, V. J. (2003) Structure and function of the tooth-epithelial interface in health and disease. *Periodontology 2000*, 31(2), pp. 12–31.

Seemann, R.; et al (2004). Levels of parotid and submandibular/sublingual salivary immunoglobulin A in response to experimental gingivitis in humans. *Clinical Oral Investigations*, 8(4), pp. 233–237.

Sexton, W. M.; et al (2001). Salivary biomarkers of periodontal disease in response to treatment. *Journal Clinical Periodontology*, 38(5), pp. 434-441.

Söder, B., Jin, L. J. e Wickholm, S. (2002). Granulocyte elastase, matrix metalloproteinase-8 and prostaglandin E2 in gingival crevicular fluid in matched

clinical sites in smokers and non-smokers with persistent periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(5), pp. 384–391.

Surna, A.; et al (2009). Lysozyme and microbiota in relation to gingivitis and periodontitis. *Medical Science Monitor*, 15(2), pp. 66–73.

Taba, M. J.; et al (2005). Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dental clinic of North America*, 49(3), pp. 551-571.

Takeuchi, Y., Yoshie, H. e Hara, K. (1991). Expression of interleukin-2 receptor and HLA-DR on lymphocyte subsets of gingival crevicular fluid in patients with periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 26(11), pp. 502-510.

Taylor, J. J. e Preshaw, P. M. (2016). Gengival crevicular fluid and saliva. *Periodontology 2000*, 70(2), pp. 7-10.

Van Steijn, G. J.; et al (2002). Effect of periodontal treatment on the activity of chitinase in whole saliva of periodontitis patients. *Journal of Periodontal Research*, 37(8), pp. 245-249.

Wong, M. Y.; et al (1999). Relationship of subgingival microbiota to a chairside test for aspartate aminotransferase in GCF. *Journal of Periodontology*, 70(1), pp. 57-62.